利用分子標幟輔助導入 *Saltol* QTL 提升耐鹽品系 CWY981126 耐鹽性之可行性

郭介煒[1]、溫甯翔[1]、郭素真[2]、林彥蓉[3]、吳永培[2,*]
[1]國立嘉義大學農藝系
[2]行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所農藝系
[3]國立臺灣大學農藝系

摘要

作物品種之耐鹽特性，有助於其生存於含鹽分較高之農地，亦為氣候變遷情境下作物耐抗非生物性逆境之一項因應調適策略。本研究乃利用耐鹽品系 CWY981126 為輪迴親，耐鹽秈稻(*indica*)品種'Pokkali'為貢獻親，利用分子標幟輔助回交法將'Pokkali'之 *Saltol* QTL 導入 CWY981126 品系中，探討是否導入 *Saltol* QTL 可增加 CWY981126 之耐鹽性。過程中各回交世代先進行 *Saltol* QTL 之前景選拔，獲選後代再經分子標幟輔助進行背景選拔。試驗結果發現，帶有 *Saltol* QTL 對偶基因之回交子代，其 BC_1F_1、BC_2F_1 及 BC_2F_2 世代遺傳背景回復至輪迴親的比率分別為 73.2、85.3 及 88.8%，而在 BC_2F_2 子代中最高者可達 97%，近似於傳統回交育種理論值 87.5%。又 BC_2F_2 子代於五葉齡時以 200 mM NaCl 模擬鹽分逆境處理後，結果發現帶有 'Pokkali' 之 *Saltol* QTL 同型合子、'Pokkali'/CWY981126 之 *Saltol* QTL 異型合子及 CWY981126 同型合子等三者間之耐鹽性無差異存在，顯示導入 *Saltol* QTLs 並無法提升耐鹽品系 CWY981126 的耐鹽表現。而以'Pokkali'、CWY981126、'IR64'及 9 個 BC_2F_3 品系於五葉齡及最高分蘗期後等時期進行 100、150、200、250 及 300mM NaCl 模擬鹽分逆境處理，結果發現各品系間耐鹽等級達顯著差異水準，其中 STP3 有較佳的耐鹽表現。而相同材料分別於五葉齡及最高分蘗期以 200 mM NaCl 進行模擬鹽分逆境評估，結果五葉齡時以品系 STP3 的耐鹽性表現最佳，而最高分蘗期則以 STP7 的耐鹽性表現最佳，甚至優於其耐鹽親本'Pokkali'。由結果顯示，本試驗雖已順利將 *Saltol* QTL 導入 CWY981126 中，惟 BC_2F_3 回交品系之耐鹽性並未能有效提昇，其原因可能是 CWY981126 耐鹽性之機制與 *Saltol* QTL 相似，由於欠缺累加效應的現象存在，致使導入 *Saltol* QTL 之效益無法顯現。

關鍵詞：分子標幟輔助選拔、耐鹽、水稻。

The Introgressionof *Saltol* QTLs into Salt Tolerant Line CWY981126 to Increase Its Salinity Tolerance by Using Marker-Assisted Selection

Chieh-Wei Kuo[1], Ning-Hsiang Wen[1], Su-Chen Kuo[2], Yann-Rong Lin[3] and Yong-Pei Wu[2,*]

[1] Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi60004, TaiwanROC

[2] Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi 60014, Taiwan ROC

[3] Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei 10617, Taiwan ROC

---

*通信作者,wuypei@dns.caes.gov.tw
投稿日期：2015 年 11 月 11 日
接受日期：2015 年 12 月 28 日
作物、環境與生物資訊 12:198-217 (2015)
Crop, Environment & Bioinformatics 12:198-217(2015)
189 Chung-Cheng Rd., Wufeng District, Taichung City 41362, Taiwan ROC

ABSTRACT

In this study, a salt-tolerant *japonica* line CWY981126 was used as the recurrent parent and a salt-tolerant *indica* variety 'Pokkali' with *Saltol* gene was used as the donor parent. Marker-assisted backcross was applied to introgress *Saltol* QTL from 'Pokkali' into CWY981126 to verify whether the salinity tolerance of CWY981126 was improved. For each backcross generation, the foreground selection of *Saltol* QTL was conducted first, and the selected progenies were subsequently subjected to background selection by marker-assisted selection. Among the backcrossed progenies carrying *Saltol* QTL, the average recovery rates of genetic background of the recurrent parent in BC_1F_1, BC_2F_1 and BC_2F_2 generations were 73.2, 85.3 and 88.8%, respectively. Moreover, the highest recovery rate was up to 97% in BC_2F_2. As compared to the theoretical value of traditional backcross breeding of BC_2F_1, 87.5%, marker-assisted selection could recover genomes of the recurrent parent CWY981126 almost same as traditional backcross breeding. When the progenies of BC_2F_2 were treated with 200 mM NaCl at the fifth-leaf stage, results showed that there was no difference among homozygotes of 'Pokkali' *Saltol* QTL, heterozygotes of 'Pokkali'/CWY981126 *Saltol* QTL, and homozygotes of CWY981126. It implied that the salinity tolerance of CWY981126 was not enhanced by introgressing *Saltol* QTL from 'Pokkali'. When 'Pokkali', CWY981126 and nine lines of BC_2F_3 were treated with solutions of five concentrations of NaCl at 100, 150, 200, 250 and 300 mM, respectively, at the fifth-leaf stage and after maximum tillering stage, results indicated that the salt-tolerant levels varied significantly among different lines. The line STP3 had the highest salt tolerance. At the concentration of 200 mM NaCl, STP3 performed the best to tolerate salt stress at the fifth-leaf stage, while STP7 had the highest salt tolerance after maximum tillering stage, even higher than 'Pokkali'. Although *Saltol* QTL seemed successfully introgressed into CWY981126 in this study, the salinity tolerance of backcross lines of BC_2F_3 was not improved effectively, suggesting that the salt-tolerant mechanism of CWY981126 might be similar to the mechanism of *Saltol* QTL. Therefore, there was no additive effect of introgression of *Saltol* QTLs.

Keywords: Marker-assisted selection (MAS), Salt tolerance, Rice.

前言

水稻(*Oryza sativa* L.)為世界上過半人口食用的重要糧食作物，由於國際糧農組織預估至 2050 年將增加 23 億的人口，據估計水稻總產量必須要增加 70%才足夠供應全球人口增長所需(FAO 2009)。然而，極端天氣、海水倒灌及過度施用化學肥料等因素造成之土壤鹽化(Ismail *et al*. 2010, Ali *et al*. 2013)，因此在不利的非生物逆境環境中種植農作物，將成為未來農業用地的選擇趨勢(Ali *et al*. 2013)。綜此糧食短缺及土壤鹽化等困境，全球專家學者莫不積極進行有關水稻耐鹽性研究。

鹽害為土壤累積過量鹽類所造成之問題，可被分類為鹼土及鹽土(IRRI 2011)，而鹽分逆境會對植株生長及生產造成明顯抑制的現象。尤其水稻被認為是對鹽分敏感型的作物，在營養生長期之早期及生殖生長期之晚期均會受到嚴重的影響(Thomson *et al*. 2010)。水稻受到鹽害主要是因為土壤中含有過多的氯化鈉(NaCl)，而鹽害又可分為滲透逆境及離子逆境兩方面。高濃度的鹽分會造成滲透勢(osmotic potential)改變，降低水稻對水分及礦物質的吸收，進而抑制稻株的生長與發育。而後土壤中大量的 Na^+與 Cl^-等毒性離子直接被水稻吸收，致使 Na^+及 Cl^-累積造成了離子失衡及滲透調節失衡，致使細胞膜及胞器受到損害，亦干擾基本元素的吸收、光合作用及蛋白質合成受抑制(Flowers and Flowers 2005)。如此，可造成生長勢降低、不正常發育或產量降低，嚴重者導致植株之死亡。Ponnamperuma (1984)指出水稻幼苗體內的 K^+濃度在激活酵素及氣孔功能中扮演著重要的角色，同時也與耐鹽性有關。Munns and James (2003)指出鹽分逆境下

Na^+ 累積在地上部與水稻植株存活率有相關性，因此對於克服鹽分逆境有效的方法即為維持植株中低 Na^+ 濃度。也有研究指出，K^+ 對於植株鹽分耐受性也有所影響，維持地上部較低的 Na^+/K^+比率，對鹽分耐受性的強度至關重要(Ren *et al*. 2005, Yamaguchi and Blumwald 2005)。由此可知，作物的耐鹽表現可透過 Na^+的排除與隔離、K^+吸收及維持 Na^+/K^+比率來提高。

由於後基因體時代的到來，學者們嘗試將分子生物技術應用於水稻育種上，提高育種效率及縮短新品種育成的時間。1997 年國際水稻基因體計畫(International Rice Genome Sequencing Project; IRGSP)針對稻「日本晴」(‘Nipponbare’)的全基因組進行水稻基因體解序，解序促使水稻基因座位置及基因功能的預測更為完整，因此也促成各類型的分子標幟蓬勃發展。透過個體間基因型的差異，可準確地將目標性狀轉移至其他品種中，利用此方法將不再受到環境影響且能提高育種效率，同時更有效縮短育成新品種之年限。目標性狀可於秧苗期進行選拔，減少人力及物力的投入，特別是透過連續的雜交、回交，可將多種優良農藝性狀堆疊於同一優良水稻品種中。

在先前的研究中，已有眾多利用分子標幟進行育種的實例，國際稻米研究所(International Rice Research Institute; IRRI)將耐淹性 *sub1* QTL 回交並轉移到‘Swarna’，同時利用非連鎖的分子標幟進行背景選拔，培育出具有耐淹基因且與原有高產農藝特性及遺傳背景相似之優良品種(Neeraja *et al*. 2007)。Lou *et al*. (2013)同樣利用此方法，將水稻半矮性基因 *sd1*、耐淹基因 *Sub1A*、抗稻熱病基因 *Pi9* 及水稻抗白葉枯病基因 *Xa21*、*Xa27* 導入到泰國香米品種中。IRRI 的育種家將水稻抗白葉枯病基因 *Xa4*、*Xa5* 及 *Xa21* 同時導入到‘IR64’，成功堆疊抗白葉枯病基因並提高‘IR64’白葉枯病抗性(Toenniessen *et al*. 2003)。其他亦有抗褐飛蝨(Suh *et al*. 2011)、耐旱(Cattivelli *et al*. 2008)、半矮性(Luo *et al*. 2014)及穀粒香味(Shi *et al*. 2008)等農藝性狀的分子標幟輔助育種實例。而在分子標幟輔助耐逆境水稻育種方面，Gregorio (1997)於國際稻米研究所所進行的研究中，利用耐鹽秈稻品種‘Pokkali’與敏感型秈稻品種‘IR29’所產生的 F_8 重組自交系進行鹽分逆境篩選，後進行增殖片段長度多型性(Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP)分子標幟之耐鹽基因圖譜定位，在第一條染色體 10.7–12.2 Mb 位置上定位出一調控 Na^+/K^+比率的耐鹽 QTL 命名為 *Saltol*。隨後 Thomson (2010)利用 F_8 重組自交系檢測 *Saltol* QTL，發現極耐鹽品系 FL478。Huyen (2012)及 Vu (2012)將帶有 *Saltol* QTL 的極耐鹽品系 FL478 與越南品種‘AS996’與‘Bacthom 7’進行雜交，並利用分子標幟回交育種法將 *Saltol* QTL 導入到‘AS996’及‘Bacthom 7’中，在 BC_4F_1 時遺傳背景回復率可高達 100%。Kuo *et al.* (2013)同樣利用分子標幟將耐鹽品系 SM61 耐鹽性導入‘IR64’，培育出數十個具有高耐鹽秈稻品系，而 Lien *et al.* (2015)則進一步以分子標幟輔助回交法將耐鹽及耐旱特性堆疊，成功培育抗二種非生物逆境之粳稻新品系。上述結果顯示，耐旱與耐鹽有關基因座雖數量龐大且組成複雜，其控制基因亦廣泛分布於水稻基因組中，在不同族群或環境中只有極少數 QTL 會持續的被檢驗出(MacMillan *et al.* 2006, Yue *et al.* 2008, Zang *et al.* 2008)，但若透過適當分子標幟輔助育種流程，仍培育出可因應全球暖化下之逆境衝擊的水稻新品種。

材料與方法

一、試驗材料及回交族群之建立

試驗材料為秈稻(*indica*)品種‘Pokkali’作為貢獻親及粳稻品系 CWY981126 作為輪迴親。‘Pokkali’為印度沿海栽培常用的極耐鹽之秈稻品種，帶有之 *Saltol* QTL 係本研究所需要目標性狀，因此以其做為貢獻親；

CWY981126 為一耐鹽粳稻品系，來自 1 mM NaN_3 (sodium azide, 疊氮化鈉) 誘導「台農 67 號」(‘TNG 67’)水稻種子所選得之嘉農育 911303 號(CNY911303)優良香米突變品系。此品系再以 100 mM EMS 進行第二次誘變，其後再以譜系法進行純化，於 M_6 世代經由耐鹽特性篩選，最後選出 7 個耐鹽突變品系，其中 CWY981126 為幼苗期高耐鹽品系，在本研究中作為導入 *Saltol* QTL 之輪迴親。試驗以‘Pokkali’及 CWY981126 雜交後，得到 F_1 種子，經自交得到帶 *Saltol* QTL 之 F_2 再與輪迴親 CWY981126 重複回交，同時建立分子標幟輔助選拔所需 BC_1F_1、BC_2F_1、BC_2F_2 之各世代材料(Fig. 1)。在各回交世代中，BC_1F_1 植株有 504 株、BC_2F_1 為 411 株、而 BC_2F_2 世代則為 544 株，在各回交世代五葉齡時期先進行 200 mM NaCl 溶液之模擬鹽分逆境處理，存活植株將進一步進行分子標幟前景選拔，確認帶有 *Saltol* QTL 之植株隨後進行分子標幟背景選拔(Fig. 2)。其中，BC_1F_1 經分子標幟背景選拔獲選之植株為 10 株，隨即透過回交單株之基因型分析，挑選出與輪迴親 CWY981126 遺傳背景相似度最高之 10 株移至田間種植，供作為母本進行回交。至於 BC_2F_1 及 BC_2F_2 獲選之耐鹽植株，同樣進行分子標幟前景及背景選拔，分別選擇帶有 *Saltol* QTL 且遺傳背景與 CWY981126 相似度最高之 10 及 9 單株進行自交。

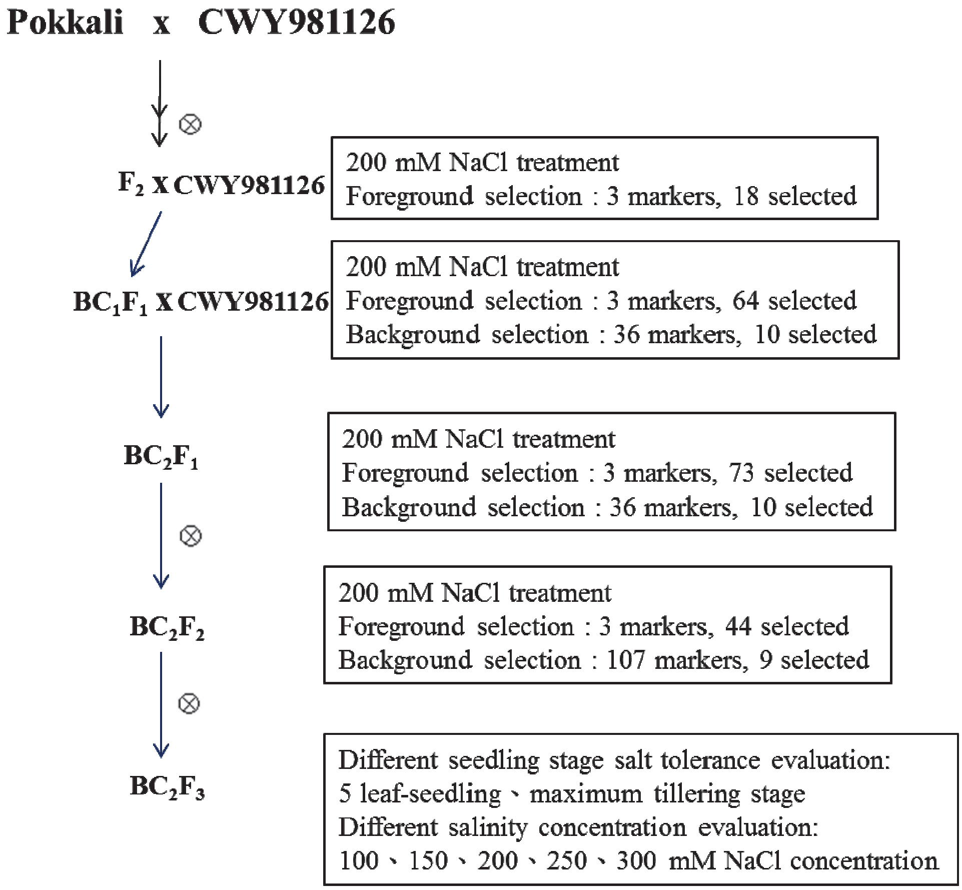
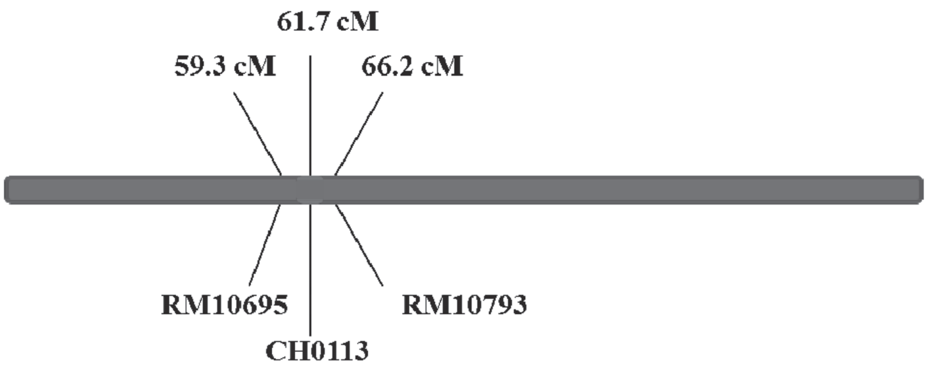


Fig. 1. Markers assisted backcross breeding scheme of pyramiding *Saltol* QTL into salt tolerance line‘CWY981126’ with detail of the salt stress treatment of 200 mM NaCl, markers used for foreground and background selection, and the numbers of plants selected in each selection.



Name	Mb	cM	Notes	Forward primer	Reverse primer
RM10695	10.98	58.1-60.6	flanking marker	ACTCCATGAAACAAACGAAC	TTGAATTCTACTAGTTTGGAAGG
CH0113	11.46	60.9-62.5	foreground *Saltol*	CCCAACGGCACATTAAAATC	GATCCTGAGACCTGACACG
RM10793	12.5	66.2	flanking marker	GACTTGCCAACTCCTTCAATTCG	TCGTCGAGTAGCTTCCCTCTCTACC

Fig. 2. The position and sequence of functional markers and flanking markers used in foreground selection of backcross lines.

二、耐鹽性之評估

1. 耐鹽表現調查

水稻種子以培養皿進行消毒及浸種發芽，點播於 60 cm × 50 cm 之 80 孔的水耕栽培盤進行水耕栽培，每孔 1 株，培養液使用改良式木村氏 B 培養液配方(Yoshida *et al*. 1976)。待全盤植株平均生長達 5-6 葉齡時，改以含有 200 mM 氯化鈉之水耕液進行模擬鹽分逆境處理，並進行植株耐鹽等級之調查。調查耐鹽等級，係依據 Jwo *et al.* (2008) 修改 IRRI 於 2002 年所制定鹽害等級分級標準之水稻標準評估系統 (Standard Evaluation System for Rice; SES)手冊，計分為六個等級，分別為 0 級：植株正常生長；1 級：植株葉片捲曲或下位葉黃化；3 級：植株葉片前端乾枯白化；5 級：植株葉片約 1/2 乾枯白化；7 級：植株葉片約 2/3 乾枯白化；及 9 級：植株完全死亡(Fig. 3)。

2. BC_2F_2 世代耐鹽篩選及評估

BC_2F_1 世代獲選之植株收穫種子於 BC_2F_2 世代時混合發芽，並種植於 80 孔水耕盤，計有 8 盤共 544 株 BC_2F_2 子代、32 株感鹽對照品種‘IR64’、32 株耐鹽親本品種‘Pokkali’及 32 株耐鹽親本品系 CWY981126，先利用 *Saltol* 前景分子標幟進行基因型分析，區分出帶 *Saltol* 區間同型合子之基因型 A (‘Pokkali’ 親本型)、不帶 *Saltol* 區間同型合子之基因型 B (CWY981126 親本型)及 *Saltol* 區間為異型結合子之基因型 H (‘Pokkali’/CWY981126)。當水稻植株生長至五葉齡時以 200 mM NaCl 模擬鹽分逆境處理，並於植株間耐鹽等級出現差異之時開始每日調查。當耐鹽對照品種 IR64 耐鹽等級達七級時使用自來水進行回復正常灌溉，待存活植株恢復生長後移植田間。

3. 耐鹽品系不同發育時期之調查

利用分子標幟輔助選拔所得到之 BC_2F_2 世代選出 STP1 至 STP9 等 9 個品系。分別於五葉齡及最高分蘗期兩個不同生長階段進行模擬鹽分逆境處理，並以耐鹽親本‘Pokkali’、CWY981126 與敏感型‘IR64’作為對照品種。其中，五葉齡逆境處理利用 37 cm × 27 cm 之 96 孔水耕栽培盤培育材料，於五葉齡階段於秧苗達到五葉齡階段時添加 200 mM NaCl 於水耕液進行模擬鹽分逆境處理，試驗以逢機完全區集設計(randomized complete block design; RCBD)設計排列，兩重複，每重複 8 株。至於最高分蘗期，則利

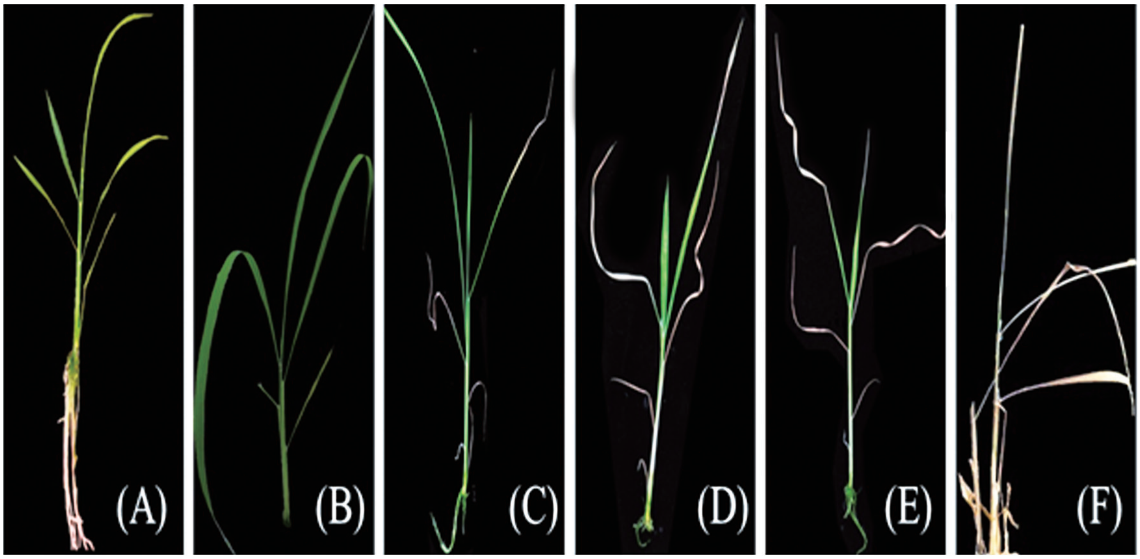


Fig. 3. Standards used for evaluating salt tolerance in rice seedlings. (A) When plant growth is normal, the scale of salt tolerance is denoted 0; (B) some leaves are rolled or discolored, the scale of salt tolerance is denoted 1; (C) some leaf tips are drying, the scale of salt tolerance is denoted 3; (D) about 1/2 leaves are drying, the scale of salt tolerance is denoted 5; (E) about 2/3 leaves are drying, the scale of salt-tolerance is denoted 7; (F) and whole plant nearly dead or wilted, the scale of salt tolerance is denoted 9.

用口徑 34 cm 之塑膠圓桶並加入 8.5 kg 乾土培育秧苗，以自來水灌溉，維持水面為土面上 3–5 cm，再於最高分蘗期曬田後以 200 mM NaCl 鹽水進行模擬鹽分逆境處理。試驗同樣以 RCBD 設計排列，3 重複，每重複 3 株，兩試驗皆於植株間耐鹽性表現出差異時為調查起始日，每日調查至植株死亡。

4. 耐鹽品系不同模擬鹽分濃度之調查

利用上述 STP1 至 STP9 等 9 個品系為材料，同時以耐鹽親本‘Pokkali’及 CWY981126 與敏感型‘IR64’作為對照品種。使用 37 cm × 27 cm 之 96 孔盤水耕栽培盤，於五葉齡階段分別添加 100 、150、200、250 及 300 mM 不同濃度之氯化鈉溶液處理，試驗以 RCBD 設計排列，兩重複，每重複 4 株，於植株表現出差異時開始調查至植株死亡。

5. 統計分析

試驗中統計分析使用 Microsoft Office Excel 2010 套裝軟體及 R 統計分析軟體(3.2.3 版)，對試驗中各葉齡處理天數之耐鹽等級進行變方分析，並於有顯著差異之項目再以 LSD (α = 0.05)進行品種(系)間比較。

三、分子標幟輔助耐鹽水稻選拔

1. 水稻基因體 DNA 萃取

水稻基因體 DNA 萃取使用 Kazuhiro *et al*. (1998)發表之 benzyl chloride 法萃取水稻 DNA。萃取流程為取水稻幼苗約 5 cm 之新鮮嫩葉，利用 Tissue Lyser (*Qiagen*, German)組織研磨機震盪成粉末，再加入 300 μL Solution I (100mM Tris-HCl, pH 9.0；40 mM EDTA, pH 8.0；1.67% SDS)混合均勻，其後加入 150 μL benzyl chloride 震盪至乳白色後，經 50℃水浴鍋 15 min 並冷卻。加入 3M NaOAc (sodium acetate; pH 5.2)並以 15,000 rpm 離心，最取上清液。再以 2 倍體積之 100% EtOH (ethanol)沉降 DNA，將 DNA 經 TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0；1 mM EDTA, pH 8.0)溶解，置於 4℃冰箱保存備用。

2. 多型性分子標幟篩選

分子標幟則利用 Thomson *et al*. (2010)進行前景選拔所使用的分子標幟，挑選在‘Pokkali’及 CWY981126 間具有多型性的分

子標幟進行分析，即 *Satol* QTL 篩選之分子標幟挑選第一條染色體 59.3–66.2 cM 位置之 3 個分子標幟進行，其中包括與 *Saltol* 緊密連鎖的一個 indel 分子標幟 CH0113 及兩個位於 *Saltol* QTL 兩側之 SSR 分子標幟 RM10793 及 RM10695 進行前景選拔(Fig. 2)。至於背景選拔所使用之分子標幟則依據 Hsu *et al.* (2012) 發表之多型性分子標幟資料，挑選輪迴親本 'Pokkali' 與 CWY981126 間具多型性的分子標幟進行分析，並額外自行設計之 SSR 及 Indel 分子標幟填補不足位置，SSR 來源根據水稻分子標幟資料庫網站，Gramene (http://www.gramene.org/markers/microsat/) 已公佈的 SSR 分子標幟序列 (Supplementary Table 18, IRGSP, 2005)，而 Indel 的設計則是根據 Shen *et al.* (2004)所發表 Indel 存在位置進行相關引設計。

3. PCR 反應、電泳分析及基因性判讀

PCR 反應流程如下：94℃設定 2 min，循環 1 次；94℃設定 30 s，55℃設定 30 s，72℃設定 30 s，共循環 35 次；72℃設定 2 min，循環 1 次；最後設定在 20℃結束。PCR 增殖產物使用 2.5% SFR 洋菜膠，利用電泳系統在 200 Volt 下持續 25 min 進行電泳分析。比對親本與子代在 PCR 增殖後的 DNA 片段大小，出現一個條帶與 'Pokkali' 品種之條帶相同，則此子代為帶有 'Pokkali' 相同 DNA 之同型結合子，基因型紀錄為 A；出現一個條帶與 CWY981126 之條帶相同，則此子代為帶有 CWY981126 相同 DNA 之同型結合子，基因型紀錄為 B；若子代同時出現兩個與兩親本相同之 DNA 條帶，則為異型結合子，基因型紀錄為 H。不論在 BC_1F_1 或 BC_2F_1 之回交後代植株，其基因型只會出現同型結合子 B 或異型結合子 H，若出現同型結合子 A 則為自交種子，此株即淘汰。

4. 遺傳相似度分析

將基因型判讀結果以 GGT graphical genotype (GGT 2.0)/2007 EDITION 軟體 (http://www.plantbreeding.wur.nl/) 進行統計分析，進一步計算出子代之遺傳背景相似度。根據上述所篩選出親本間具有多型性的分子標幟在 RAP-DB 網站所公布的 BAC/PAC 位置，換算成 IRGSP (The International Rice Genome Sequencing Project) 網站 Build 5 版公布的 'Nipponbare'/'Kasalath' 雜交族群連鎖圖譜位置，並將結果利用 GGT 2.0 繪出連鎖圖譜。

結果

一、分子標幟輔助耐鹽稻之選育

1. 分子標幟前景選拔

在經 *Saltol* QTL 基因型判讀於 F_2 世代確認子代帶有 *Saltol* QTL 片段同型結合子基因型後代回交至 CWY981126，其後陸續得到之 BC_1F_1 及 BC_2F_1 世代乃選取帶有 'Pokkali'/CWY981126 異型結合子基因型之植株，而 BC_2F_2 則選取帶有 'Pokkali' 同型結合子基因型之植株。獲選出之植株，除 F_2 世代之外，其餘世代均進行分子標幟背景選拔。

經模擬耐鹽性選拔存活植株，進一步利用 CH0113、RM10793 及 RM10695 進行分子標幟前景選拔(Fig. 2)，結果於 F_2、BC_1F_1、BC_2F_1 及 BC_2F_2 世代分別共選出 18、56、64 及 44 株，選出之植株表示於 *Saltol* QTL 區間帶有欲轉移 'Pokkali' 之目標基因片段。

2. 分子標幟背景選拔

利用分布在 12 條水稻染色體上，共 107 個分子標幟進行背景基因型判讀，其中包括 70 個 SSR 分子標幟、8 個 STS 分子標幟及 29 個 indel 分子標幟(Fig. 4 及 Table 1)。經耐鹽性選拔及分子標幟前景選拔後，其 F_2、BC_1F_1、BC_2F_1 及 BC_2F_2 世代之 18、56、64、44 株分別進行背景選拔。而 BC_1F_1 植株使用分布在 12 條水稻染色體上之 36 個分子標幟進行，即每條染色體分別選用 3 個分子標幟，結果發現 56 株耐鹽 BC_1F_1 植株與 CWY981126 的遺傳相似度範圍為 63-83%，總體平均值約為 73.2%；其中選出遺傳相似度最高之 10 株，與 CWY981126 之遺傳相似

度分別為 82.35、80.9、80.2、80、79.6、79.5、79.1、78.2、78.1 及 77.2%，遺傳相似度平均值為 79.5% (Table 2)。該 10 個植株移至田間栽培，並作為母本使用與 CWY981126 回交。而在 64 株耐鹽且帶有 *Saltol* QTL 之 BC_2F_1 回交後代背景選拔中，選擇與 BC_1F_1 完全不重複之 36 個分子標幟進行，以避免相同之基因體片段重複篩選，降低分子標幟背景選拔效率，其中每條水稻染色體上選用 3 個分子標幟，共包括 24 個 SSR 分子標幟、2 個 STS 分子標幟及 10 個 indel 分子標幟(Table 1)。背景選拔結果顯示，BC_2F_1 與 CWY981126 遺

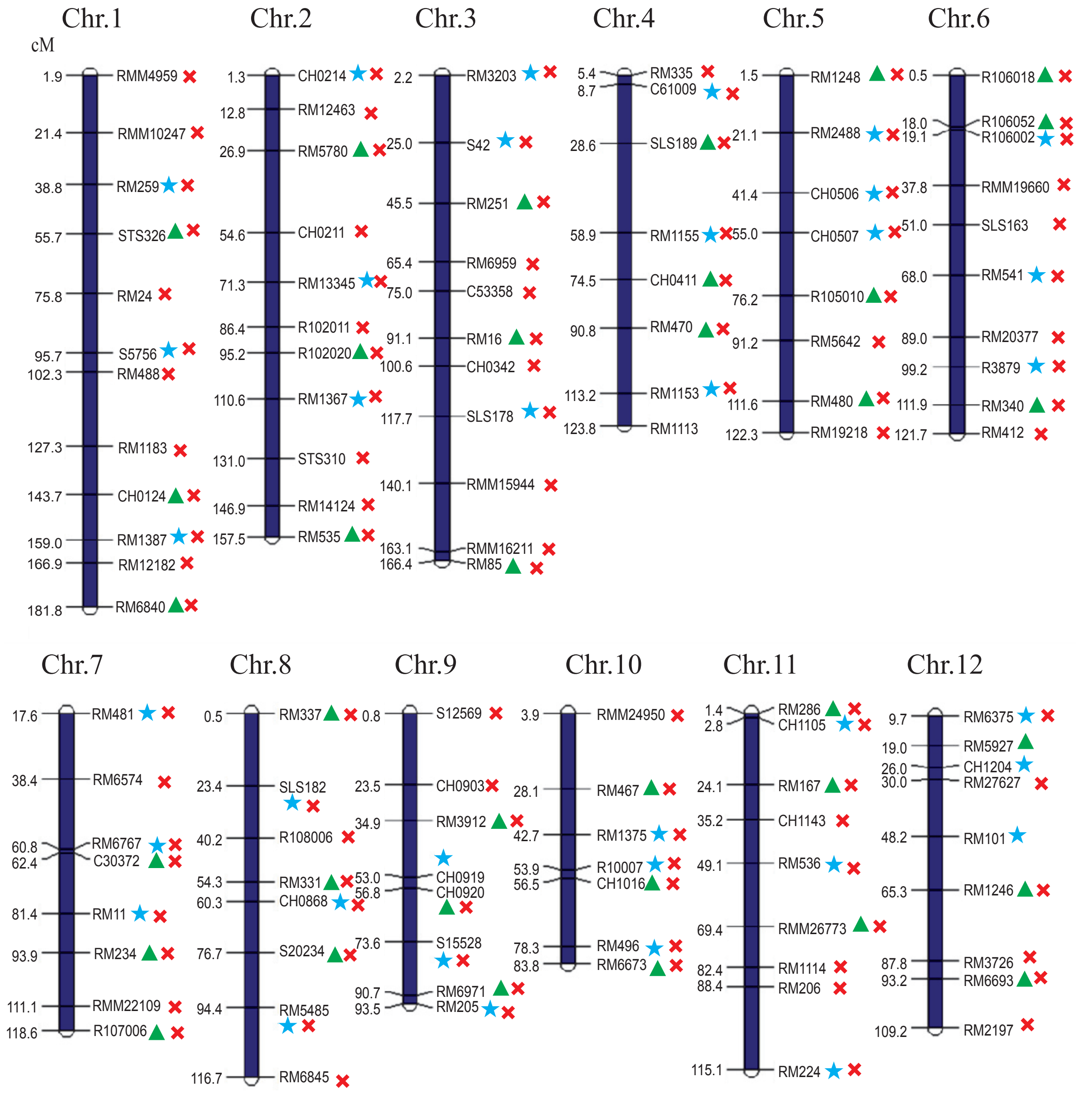


Fig. 4. The polymorphic markers used for background selection of japonica type gene pyramiding population. 36 markers among all markers were applied to BC_1F_1 background selection (red star). 36 markers among all markers were applied to BC_2F_1 background selection (blue triangle). 107 markers among all markers were applied to BC_2F_2 background selection (green circle). The prefixes RM indicates SSR markers, C, R, S or E indicates STS markers, and CH, STS, SLS or RI indicates indel markers.

傳相似度之範圍為 75–95%，平均值約為85%，其中選出 10 株與 CWY981126 遺傳相似度較高，分別為 94.15、92.55、92.2、92.15、91.75、91.55、91.55、90.8、90.45 及 90.2% (Table 2)，其平均值為 91.7%，將獲選 10 株 BC_2F_1 植株進行自交獲得 BC_2F_2 世代。經模擬耐鹽處理及前景選拔選獲 44 株耐鹽，以此帶 *Saltol* QTL 之 BC_2F_2 回交後代進行背景選拔。為達到覆蓋整個水稻基因體的背景選拔效果，因此挑選了 107 個分布於 12 條水稻染色體上的多型性分子標幟(Fig. 4)，其中包括 69 個 SSR 分子標幟、9 個 STS 分子標幟及 29 個 indel 分子標幟(Table 1)，以此 107 個分子標幟進行 BC_2F_2 回交後代之基因型判讀。結果顯示，此 44 株與 CWY981126 遺傳相似度範圍為 82–97%，整體平均約為 89%，其中遺傳相似度較高之前五株皆高於 95%，最高者可達 97.3% (Table 2)。結果顯示，該 5 株 BC_2F_2 回交後代之遺傳背景大致上已回復至輪迴親 CWY981126 之遺傳背景，可知利用分子標幟輔助選拔進行前景選拔，可準確地將目標性狀轉移進入輪迴親。再者，以此分子標幟輔助選拔選出之遺傳背景相似度與傳統回交育種之理論值相比，在 BC_1 世代及 BC_2 世代利用分子標幟輔助選育之遺傳背景相似度分別為 79.5%及 91.7%，而傳統回交育種之理論值分別為 75%及 87.5%，顯示利用分子標幟輔助選育可有效提高回交後代與輪迴親之遺傳背景相似度，有效提高回交後代基因組回復至輪迴親的速度，而有利於耐鹽水稻的選育效率，更縮短了育種年限(Fig. 5)。

二、回交後代耐鹽性之評估

1.BC_2F_2 世代耐鹽性篩選及評估

BC_2F_2 世代進行 *Saltol* 前景分子標幟分析及 200mM NaCl 模擬鹽分逆境處理後，將材料依 *Saltol* QTL 之基因型進行區分，即 111 株帶 A 基因型(帶 *Saltol* QTL 之同型結合子)，109 株帶 B 基因型(不帶 *Saltol* QTL 之同型結合子)，248 株帶 H 基因型(*Saltol* QTL 為

Table 1. The number of polymorphic markers between'Pokkali' and CWY981126 used for background selection of *Saltol*QTL pyramiding population.

Backcross generation	Chromosome	Genetic marker			
		SSR	STS	Indel	total
BC_1F_1	1	2	1	0	3
	2	2	0	1	3
	3	1	1	1	3
	4	2	1	0	3
	5	1	0	2	3
	6	1	1	1	3
	7	3	0	0	3
	8	1	0	2	3
	9	1	1	1	3
	10	2	0	1	3
	11	2	0	1	3
	12	2	0	1	3
	Sum	20	5	11	36
BC_2F_1	1	1	0	2	3
	2	3	0	0	3
	3	3	0	0	3
	4	1	0	2	3
	5	2	0	1	3
	6	1	0	2	3
	7	1	1	1	3
	8	2	1	0	3
	9	2	0	1	3
	10	2	0	1	3
	11	3	0	0	3
	12	3	0	0	3
	Sum	24	2	10	36
BC_2F_2	1	9	1	2	12
	2	6	0	5	11
	3	7	2	2	11
	4	5	1	2	8
	5	5	0	3	8
	6	5	1	4	10
	7	6	1	1	8
	8	4	1	3	8
	9	3	2	3	8
	10	5	0	2	7
	11	7	0	2	9
	12	7	0	0	7
	Sum	69	9	29	107

Table 2. The genome composition of BC_2F_2 derived from varieties 'Pokkali' and 'TK9' by 107polymorphic markers usedforMAS.

Individual*	A (%)[a]	B (%)[b]	H (%)[c]	N (%)[d]	RPG recovered (%)	Total (cM)	Recombinant[e]	H-segment[f]
CWY981126	0	100	0	0	100	1463.7	0	0
74	1.2	95.7	3.2	0	97.3	1463.7	6	2
511	0	93.2	6.8	0	96.6	1463.7	10	5
132	2.5	95.4	2.1	0	96.45	1463.7	7	2
115	3.6	94.6	1.8	0	95.5	1463.7	8	2
507	3.1	93.6	1.8	1.5	94.5	1463.7	10	2
216	1.4	86.9	11.7	0	92.75	1463.7	11	5
317	3.5	90.3	4.9	1.4	92.75	1463.7	17	5
364	3.5	87.8	7.1	1.6	91.35	1463.7	14	4
515	3.4	86.8	8.8	1.1	91.2	1463.7	15	5
204	3.9	84.8	11.3	0	90.45	1463.7	19	7
336	3.8	85.5	9.2	1.6	90.1	1463.7	16	5
88	4	84.7	10.4	0.9	89.9	1463.7	18	6
191	6.9	85.7	7.3	0	89.35	1463.7	20	5
282	7.6	86.4	5.9	0	89.35	1463.7	15	3
359	6.4	84.4	9.3	0	89.05	1463.7	20	8
396	8.1	88.1	1.8	1.9	89	1463.7	13	1
455	6.5	84.5	8.4	0.5	88.7	1463.7	13	5
394	6.2	84.1	9.2	0.5	88.7	1463.7	19	5
420	2.9	83.3	10.5	3.3	88.55	1463.7	18	6
520	10.4	87.5	1.5	0.5	88.25	1463.7	16	1
85	6.6	83.8	8.7	0.8	88.15	1463.7	21	5
532	4.7	80.9	14.4	0	88.1	1463.7	19	7
541	3.7	82	12.1	2.2	88.05	1463.7	20	7
476	5.4	81.7	12	0.9	87.7	1463.7	20	5
370	4.3	82.4	10.4	2.9	87.6	1463.7	15	3
97	7.6	84.2	6.6	1.6	87.5	1463.7	19	6
287	5.9	80.5	13.7	0	87.35	1463.7	24	9
529	4.6	79.6	14.7	1.1	86.95	1463.7	23	9
452	7.4	80.3	12.2	0	86.4	1463.7	16	4
404	7.9	80.9	10.6	0.5	86.2	1463.7	16	4
543	9.3	82.2	7.2	1.4	85.8	1463.7	22	6
393	10.2	80.9	8.9	0	85.35	1463.7	23	8

[a] Variety name (arrangement by RPG recovered of CWY981126.). RPG: recurrent parent genome.
[b] The percent of Hang-Yu 15 genome.
[c] The percent of recurrent parent genome.
[d] The percent of heterozygote.
[e] The frequency of cross-over happened in chromosome segment.
[f] Amount of heterozygote in all markers.

異型結合子)等三型，三個基因型比率符合 1：2：1 之理論分離比率。耐鹽等級調查結果，如 Fig. 6 及 Table 3 所示。在處理後第四天除‘Pokkali’及 CWY981126 外，所有回交後代及感鹽對照品種‘IR64’的耐鹽等級均達五級，在第六天‘IR64’耐鹽等級達七級。其後經回復正常灌溉調查植株恢復狀況，結果發現 CWY981126 恢復狀況較 BC_2F_2 回交後代差，回復後第二天所有回交後代的耐鹽等級表現均優於耐鹽輪迴親 CWY981126 及感鹽對照

Table 3. The scales of salttolerance for salt sensitive variety ‘IR64’, salt tolerant parents ‘Pokkali’ and CWY981126, and BC_2F_2 progeny derived from the backcross of ‘Pokkali’ and CWY981126 (which contain A, B, H genotype) at 5-leafseedling stage under 200 mM NaCl treatment.

		Scale of salt-tolerance							
		Days after treatment							
Treatment	Line or variety	2	3	4	5	R0	R1	R2	R3
5-leaf seedling stage 200 mM NaCl	A	3.2a	3.4a	5.1a	6.5a	6.7ab	6.6ab	6.6b	6.6ab
	B	3.2a	3.3a	5.0a	6.4ab	6.5b	6.5b	6.6ab	64b
	H	3.1a	3.4a	4.9a	6.3ab	6.8b	6.5b	6.6b	6.5b
	Pokkali	3.0a	3.0a	3.0b	3.8c	4.5c	4.5c	4.9c	4.6c
	IR64	3.3a	3.4a	5.4a	6.6a	7.3a	7.3a	7.3a	7.1a
	CWY981126	3.0a	3.2a	4.9a	5.9b	6.4b	6.4b	6.8ab	6.9ab

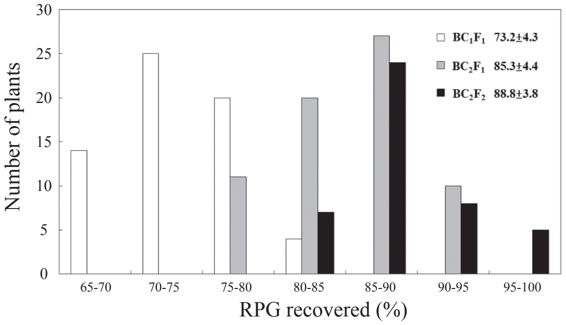


Fig. 5. The frequency distribution of recurrent parent genome (RPG) recovery rate using marker-assisted backcrossing in BC_1F_1, BC_2F_1 and BC_2F_2 populations derived from the backcross of ‘Pokkali’/CWY981126. The numbers inside the right side of frame indicate the mean values of RPG recovered.

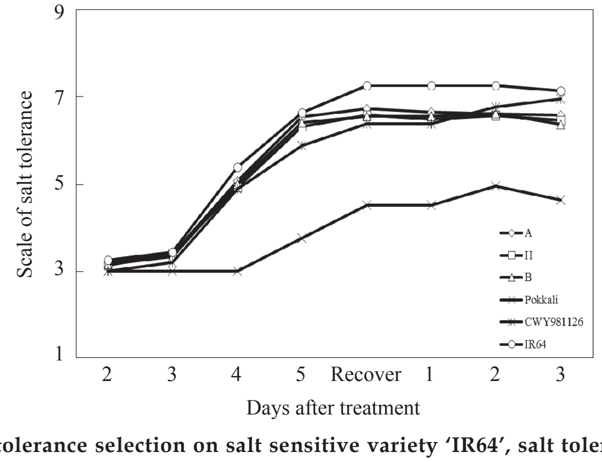


Fig. 6. The scales of salttolerance selection on salt sensitive variety ‘IR64’, salt tolerance parents ‘Pokkali’ and CWY981126 and BC_2F_2 progenies derived from the backcross of ‘Pokkali’/CWY981126 (which contain A, B, H genotype) under 200 mM NaCl treatment.

品種'IR64'。而經變方分析結果顯示，在處理第 4 日至復水後 3 日間之三個基因型間的耐鹽等級表現並無顯著差異，即基因型 A、B、H 及品系 CWY981126 間之耐鹽等級表現無顯著差異存在。

2. BC_2F_3 品系於不同鹽分濃度下之耐鹽性評估

獲選之 BC_2F_3 等 9 個品系、'Pokkali'、CWY981126 及'IR64'五葉齡期進行 100、150、200、250 及 300 mM 等不同濃度之氯化鈉模擬鹽分逆境處理，結果如 Table 4 所示。在 100 mM NaCl 處理下，各品系之耐鹽等級表現於第 2 日出現差異，故於第 2 日開始進行耐鹽等級調查至處理第 22 日；至處理後第 7 日耐鹽對照品種'IR64'耐鹽等級已達 5 級，其餘品種(系)耐鹽等級上則維持於 3–4 級；而至第 9 日除了耐鹽親本'Pokkali'外，其餘品種(系)耐鹽等級均達 5 級以上，其中 STP8 之耐鹽表現在參試品系中最優異，與表現最差之 STP6 耐鹽等級差異約高達 1.8 級；而於處理第 12 日時，除了'Pokkali'及 STP8 之外，其餘品種(系)耐鹽等級均達 7 級以上。經變方分析結果，顯示各品種(系)間耐鹽等級表現在第 2、4 日及 7 至 20 日均達顯著水準，其中 STP3、STP7、STP8 及耐鹽親本'Pokkali'在氯化鈉濃度 100 mM 下有較佳的耐鹽表現(Fig. 7)。

各品系在 150 mM NaCl 模擬鹽分逆境下，處理至第 2 日耐鹽等級之表現出現差異，因此開始進行調查直至 20 日，耐鹽表現狀況與 100 mM 濃度相似；在處理第 9 日，除耐鹽親本'Pokkali'與 STP8 外，其餘品種(系)耐鹽等級皆達 5 級，而感鹽品種'IR64'之耐鹽等級則達 7 級；處理 12 日除'Pokkali'外，其餘品種(系)耐鹽等級均達 7 級，感鹽對照品種'IR64'則趨近於死亡。經變方分析結果，顯示處理第 2、3 日及 5 至 20 日品系間耐鹽等級表現均達顯著差異水準，其中以品系 STP8 有最佳的耐鹽表現，STP3、STP7 及 STP9 的耐鹽表現亦佳。

在模擬鹽分逆境為 200 mM NaCl 時，處理第 2 日時各品系間耐鹽等級表現出差異，開始調查直至處理第 15 日，除'Pokkali'之植株尚未死亡，其餘品種(系)之植株皆死亡。處理結果發現，第 6 日除'Pokkali'外，其餘品種(系)之耐鹽等級均達 5 級，而感鹽對照組'IR64'之耐鹽等級則已達 7 級；處理第 8 日除'Pokkali'及 STP3 外，其餘品種(系)耐鹽等級均達 7 級。經變方分析結果，顯示處理後每日品系間之耐鹽等級表現均達顯著差異水準，且以品系 STP3 的耐鹽表現較佳。

在模擬鹽分濃度 250 mM NaCl 下，處理第 2 日品系間耐鹽等級表現已開始出現差異，故開始調查直至處理第 9 日。結果顯示，在處理第 3 日除耐鹽親本'Pokkali'外，其餘品系耐鹽等級均接近 5 級或 5 級以上；處理第 5 日所有品系耐鹽等級均達 7 級以上。經變方分析結果，顯示處理後每日品系間之耐鹽等級表現均達顯著差異水準，品種間的耐鹽表現除'IR64'級 STP2 表現明顯較差之外，其餘品系之表現較難明顯區分出耐鹽表現較佳的品種(系)。

當鹽分濃度提高到 300 mM NaCl 時，結果顯示在處理第 3 日所有品種(系)之耐鹽等級均達 5 級以上，處理第 5 日所有品種(系)耐鹽等級達 7 級以上，而感鹽對照品種'IR64'耐鹽等級接近 9 級。經由變方分析，結果顯示處理後每日品系間之耐鹽等級表現均達顯著差異水準，但獲選之耐鹽品系中並無耐鹽表現明顯優越品系，惟感鹽品種'IR64'及 STP2 之耐鹽表現較差。

3. BC_2F_3 品系於不同生長期之耐鹽性評估

BC_2F_2 回交世代透過 MAS 選出 9 株與 CWY981126 遺傳相似度最高之植株，經加入耐鹽親本'Pokkali'、CWY981126 及敏感'IR64'做為對照，所有材料於代表秧苗期及成株期之五葉齡及最高分櫱期進行 200mM NaCl 之模擬鹽分逆境處理，結果如 Table 5 所示。在五葉齡 200 mM NaCl 模擬鹽分逆境處理下，處理後第 2 日，各品系間耐鹽等級表現即出現差異，經耐鹽等級調查至處理第 15 日，除耐鹽親本'Pokkali'植株未全數死亡

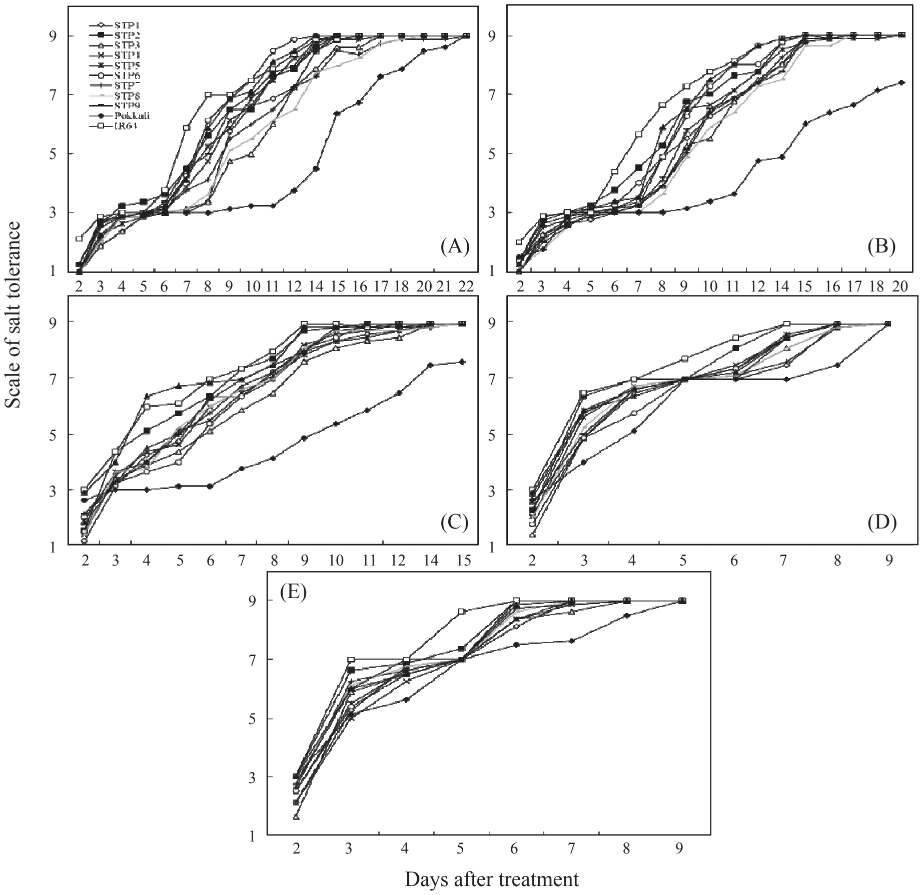


Fig. 7. The evaluation of salt tolerance scales on salttolerant variety 'Pokkali', salt tolerant line CWY981126, salt susceptible variety 'IR64' and 9 BC_2F_3 lines derived from the backcross of 'Pokkali'/'CWY981126 at five-leaf seedling stage under treatments with different concentrations of NaCl: (A) 100mM , (B) 150 mM, (C) 200 mM, (D) 250 mM and (E) 300 mM.

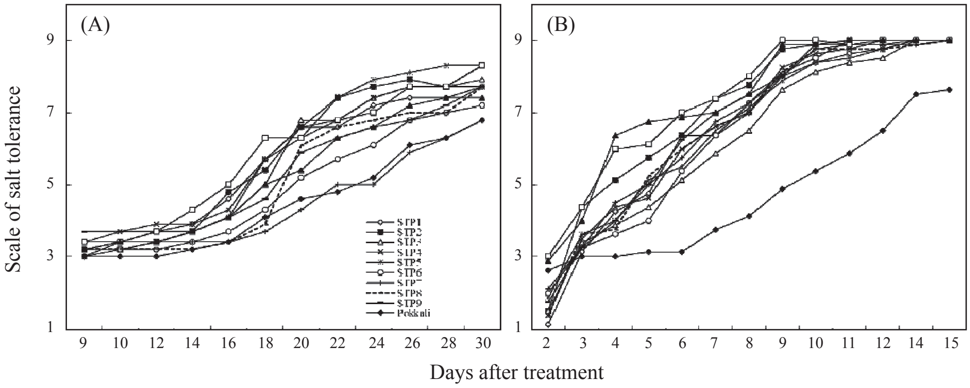


Fig. 8. The evaluation of salt tolerance scales on salttolerant variety 'Pokkali', salt tolerant line CWY981126, salt susceptible variety 'IR64' and 9 BC_2F_3 lines derived from the backcross of 'Pokkali'/CWY981126 at (A) five-leaf seedling stage and (B) after maximum tillering stage under 200 mM NaCl treatment.

Table 4. The scale of salt tolerance for 'Pokkali',CWY981126, 'IR64' and 9 BC_2F_3 lines under different NaCl concentration treatments at 5-leafseedling stage.

NaCl concentration	Line or variety	Scale of salt tolerance*																		
		Days after treatment																		
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	17	18	20	21	22
100 mM NaCl	STP1	1.0b	1.9	2.4b	2.9	3.0	3.0c	3.4ef	5.8abcd	6.6ab	6.9bcd	7.3bc	8.5abcd	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0
	STP2	1.3b	2.6	3.3a	3.4	3.6	4.5ab	5.6abc	6.5abc	6.5abc	7.6abc	7.9ab	8.6abcd	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0
	STP3	1.0b	1.9	2.4b	2.9	3.0	3.1bc	3.4ef	4.8d	5.0c	6.0d	7.3bc	7.9bcd	8.6ab	8.6ab	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0
	STP4	1.0b	2.1	2.9ab	2.9	3.1	3.9bc	4.8bcde	6.1abcd	6.6ab	7.6abc	7.9ab	8.8abc	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0
	STP5	1.0b	2.3	2.6ab	2.9	3.3	4.3bc	5.3bc	5.9abcd	6.9ab	7.5abc	8.3ab	8.5abcd	8.9a	8.9ab	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0
	STP6	1.0b	2.6	2.9ab	3.0	3.0	4.3bc	6.1ab	6.9ab	7.5a	8.5a	8.9a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0
	STP7	1.0b	2.5	2.9ab	3.0	3.1	3.9bc	4.1cdef	5.5bcd	6.0abc	6.5cd	7.3bc	7.6d	8.5ab	8.4ab	8.8a	8.9a	8.9a	8.9a	9.0
	STP8	1.0b	2.0	2.9ab	3.0	3.0	3.1bc	3.6ef	5.1cd	5.5bc	6.1d	6.5c	7.8cd	8.0b	8.3b	8.8a	8.9a	9.0a	9.0a	9.0
	STP9	1.3b	2.8	2.9ab	2.9	3.4	4.5ab	5.0bcd	6.5abc	7.0ab	7.8abc	8.0ab	8.9ab	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0
	Pokkali	1.0b	2.6	3.0ab	3.0	3.0	3.0c	3.0f	3.1e	3.3d	3.3e	3.8d	4.5e	6.4c	6.8c	7.6b	7.9b	8.5b	8.6b	9.0
	IR64	2.1a	2.9	3.0ab	3.0	3.8	5.9a	7.0a	7.0a	7.5a	7.9ab	8.4a	8.9ab	8.9a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0
	CWY981126	1.0b	2.3	2.9ab	3.0	3.3	4.1bc	5.9ab	6.9ab	7.1a	8.1ab	8.5a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0
150 mM NaCl	STP1	1.4ab	2.3ab	2.6	2.8b	3.0b	3.3c	4.9bcd	5.5bcd	6.3bcd	6.8bc	7.4b	8.0abc	8.8a	8.9a	9.0a	9.0a	9.0a		
	STP2	1.4ab	2.8ab	3.0	3.3a	3.8ab	4.5ab	5.3abc	6.8ab	7.0abc	7.6abc	7.8ab	8.8abc	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a		
	STP3	1.0b	2.3ab	2.8	3.0ab	3.1b	3.4bc	3.9cde	5.3bc	5.5d	6.8bc	7.5ab	8.0abc	8.9a	8.9a	9.0a	9.0a	9.0a		
	STP4	1.0b	2.1ab	2.6	2.9ab	3.1b	3.5bc	4.9bcd	6.5abc	6.6abcd	7.1abc	7.8ab	8.8ab	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a		
	STP5	1.4ab	2.1ab	2.6	2.9ab	3.0b	3.3c	4.1cdef	5.8abcd	6.4abcd	7.1abc	7.8ab	8.5abc	8.8a	8.9a	8.9a	8.9a	9.0a		
	STP6	1.4ab	2.9a	3.0	3.1ab	3.3b	4.0bc	4.9bcd	6.3abc	7.3abc	8.0ab	8.0ab	8.8ab	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a		
	STP7	1.3ab	2.5ab	2.8	3.0ab	3.1b	3.3c	3.9cde	5.0c	6.4abcd	6.9abc	7.4b	8.3abc	8.9a	8.9a	8.9a	8.9a	9.0a		
	STP8	1.1ab	1.8b	2.5	3.0ab	3.0b	3.0c	3.6de	4.9c	5.9cd	6.4c	7.3b	7.5c	8.6a	8.6a	9.0a	9.0a	9.0a		
	STP9	1.0b	2.0ab	2.5	3.0ab	3.0b	3.3c	3.9cde	5.1bc	6.5abcd	6.9abc	7.4b	7.8bc	8.9a	8.9a	9.0a	9.0a	9.0a		
	Pokkali	1.5ab	1.8ab	2.9	3.0ab	3.0b	3.0c	3.0e	3.1d	3.4e	3.6d	4.8c	4.9d	6.0b	6.4b	6.6b	7.1b	7.4b		
	IR64	2.0a	2.9a	3.0	3.0ab	4.4a	5.6a	6.6a	7.3a	7.8a	8.1a	8.6a	8.9a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a		
	CWY981126	1.3ab	2.6	2.9	3.1ab	3.4b	3.5bc	5.9ab	6.5abc	7.5ab	8.0ab	8.6a	8.9a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a		
200 mM NaCl	STP1	1.1d	3.1b	4.3cd	4.8bcde	6.4ab	6.4ab	7.0ab	8.0ab	8.4a	8.6a	8.8a	9.0a	9.0a						
	STP2	1.5d	4.4a	5.1abc	5.8abc	6.4ab	7.4a	7.8ab	8.8ab	8.9a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a						
	STP3	1.5d	3.4	3.9cd	4.4cde	5.1b	5.9b	6.5b	7.6b	8.1a	8.4a	8.5a	9.0a	9.0a						
	STP4	1.4d	3.5ab	4.4cd	4.6bcde	6.0ab	6.6ab	7.0ab	8.3ab	8.6a	8.8a	9.0a	9.0a	9.0a						
	STP5	1.9bcd	3.6ab	4.0cd	5.1abcd	5.5ab	6.5ab	7.1ab	7.9ab	8.4a	8.5a	8.8a	9.0a	9.0a						
	STP6	2.0abcd	3.3b	3.6cd	4.0de	5.4ab	6.3ab	7.3ab	8.1ab	8.5a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a						
	STP7	2.1abcd	3.3b	4.5bcd	5.0bcd	5.8ab	6.8ab	7.3ab	8.0ab	8.8a	8.9a	8.9a	8.9a	9.0a						
	STP8	1.4d	3.6ab	3.8cd	5.3abcd	6.0ab	6.6ab	7.0ab	8.1ab	8.8a	8.8a	8.8a	8.9a	9.0a						
	STP9	1.8cd	3.3b	4.0cd	5.0bcd	6.3ab	7.0ab	7.5ab	8.0ab	8.9a	8.9a	8.9a	9.0a	9.0a						
	Pokkali	2.6abc	3.0b	3.0d	3.1e	3.1c	3.8c	4.1c	4.9c	5.4b	5.9b	6.5b	7.5b	7.6b						
	IR64	3.0a	4.4a	6.0ab	6.1ab	7.0a	7.4a	8.0a	9.0a	9.0a	8.9a	9.0a	9.0a	9.0a						
	CWY981126	2.9ab	4.0ab	6.4a	6.8a	6.9a	7.0ab	7.5ab	8.9ab	8.9a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a						

Table 4. (continued)

NaCl concentration	Line or variety	Scale of salt tolerance*																		
		Days after treatment																		
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	17	18	20	21	22
250 mM NaCl	STP1	2.1abc	4.9bc	6.6ab	7.0b	7.0c	7.5cd	9.0a	9.0											
	STP2	2.3abc	6.4a	7.0a	7.0b	8.1ab	9.0a	9.0a	9.0											
	STP3	1.4c	4.9bc	6.5ab	7.0b	7.1c	8.1abc	8.9a	9.0											
	STP4	2.0abc	5.6ab	6.8a	7.0b	7.5bc	8.5ab	9.0a	9.0											
	STP5	2.3abc	5.9ab	6.4ab	7.0b	7.4bc	8.6a	9.0a	9.0											
	STP6	1.8bc	4.9bc	5.8bc	7.0b	7.4bc	8.5ab	9.0a	9.0											
	STP7	2.8ab	5.8ab	6.6ab	7.0b	7.1c	7.6bcd	8.9a	9.0											
	STP8	2.0abc	5.3b	6.8a	7.0b	7.1c	8.1abc	8.9a	9.0											
	STP9	2.5ab	5.0bc	6.6ab	7.0b	7.0c	8.5ab	9.0a	9.0											
	Pokkali	2.6ab	4.0c	5.1c	7.0b	7.0c	7.0d	7.5b	9.0											
	IR64	3.0a	6.5a	7.0a	7.8a	8.5a	9.0a	9.0a	9.0											
	CWY981126	2.9a	5.9ab	6.6ab	7.0b	7.3c	8.5ab	9.0a	9.0											
300 mM NaCl	STP1	2.1bc	5.3cde	6.8a	7.0b	8.1bc	9.0a	9.0a	9.0											
	STP2	3.0a	6.6ab	6.9a	7.4b	9.0a	9.0a	9.0a	9.0											
	STP3	1.6c	5.9bcde	6.5ab	7.0b	8.4ab	8.6a	9.0a	9.0											
	STP4	2.1bc	5.0e	6.3ab	7.0b	8.4ab	8.9a	9.0a	9.0											
	STP5	2.5ab	5.5cde	6.6a	7.0b	8.4ab	9.0a	9.0a	9.0											
	STP6	2.5ab	5.4cde	6.5ab	7.0b	9.0a	9.0a	9.0a	9.0											
	STP7	2.6ab	6.3abc	6.6a	7.0b	9.0a	9.0a	9.0a	9.0											
	STP8	2.8ab	6.1abcd	6.8a	7.0b	8.6ab	9.0a	9.0a	9.0											
	STP9	2.8ab	6.0abcd	7.0a	7.0b	8.8ab	8.9a	9.0a	9.0											
	Pokkali	3.0a	5.1de	5.6b	7.0b	7.5c	7.6b	8.5b	9.0											
	IR64	3.0a	7.0a	7.0a	8.6a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0											
	CWY981126	3.0a	6.0abcd	6.5ab	7.0b	8.9ab	9.0a	9.0a	9.0											

*Means with the same letter of a row are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

Table 5.The scales of salt tolerance for 'Pokkali', 'IR64', CWY981126 and 9 BC_2F_3 lines at 5-leaf seedling stage and after maximum tillering stage under 200 mM NaCl.

		Scale of salt tolerance*																				
		Days after treatment																				
Stage	Line or variety	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	18	20	22	24	26	28	30
5-leaf seedling stage	STP1	1.1d	3.1b	4.3cd	4.8bcde	6.4ab	6.4ab	7.0ab	8.0ab	8.4a	8.6a	8.8a	9.0a	9.0a								
	STP2	1.5d	4.4a	5.1abc	5.8abc	6.4ab	7.4a	7.8ab	8.8ab	8.9a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a								
	STP3	1.5d	3.4	3.9cd	4.4cde	5.1b	5.9b	6.5b	7.6b	8.1a	8.4a	8.5a	9.0a	9.0a								
	STP4	1.4d	3.5ab	4.4cd	4.6bcde	6.0ab	6.6ab	7.0ab	8.3ab	8.6a	8.8a	9.0a	9.0a	9.0a								
	STP5	1.9bcd	3.6ab	4.0cd	5.1abcd	5.5ab	6.5ab	7.1ab	7.9ab	8.4a	8.5a	8.8a	9.0a	9.0a								
	STP6	2.0abcd	3.3b	3.6cd	4.0de	5.4ab	6.3ab	7.3ab	8.1ab	8.5a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a								
	STP7	2.1abcd	3.3b	4.5bcd	5.0bcd	5.8ab	6.8ab	7.3ab	8.0ab	8.8a	8.9a	8.9a	8.9a	9.0a								
	STP8	1.4d	3.6ab	3.8cd	5.3abcd	6.0ab	6.6ab	7.0ab	8.1ab	8.8a	8.8a	8.8a	8.9a	9.0a								
	STP9	1.8cd	3.3b	4.0cd	5.0bcd	6.3ab	7.0ab	7.5ab	8.0ab	8.9a	8.9a	8.9a	9.0a	9.0a								
	Pokkali	2.6abc	3.0b	3.0d	3.1e	3.1c	3.8c	4.1c	4.9c	5.4b	5.9b	6.5b	7.5b	7.6b								
	IR64	3.0a	4.4a	6.0ab	6.1ab	7.0a	7.4a	8.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a								
	CWY981126	2.9ab	4.0ab	6.4a	6.8a	6.9a	7.0ab	7.5ab	8.9ab	8.9a	9.0a	9.0a	9.0a	9.0a								
After maxium tillering	STP1								3.4	3.4		3.7	3.9		4.6	5.7ab	6.6a	6.6abc	7.2a	7.4ab	7.4ab	7.7
	STP2								3.2	3.2		3.4	3.7		4.8	5.4ab	6.6a	7.4a	7.7a	7.9a	7.7ab	8.3
	STP3								3.2	3.2		3.4	3.7		4.1	5.0ab	6.8a	6.8ab	7.4a	7.7a	7.7ab	7.9
	STP4								3.4	3.7		3.9	3.9		4.3	5.7ab	6.6a	6.8ab	7.4a	7.7a	7.7ab	7.7
	STP5								3.0	3.4		3.4	3.7		4.1	5.7ab	6.3ab	7.4a	7.9a	8.1a	8.3a	8.3
	STP6								3.0	3.2		3.2	3.4		3.7	4.3ab	5.2abc	5.7bcd	6.1abc	6.8abc	7.0ab	7.2
	STP7								3.2	3.4		3.4	3.4		3.4	3.7b	4.3c	5.0cd	5.0c	5.9c	6.3b	6.8
	STP8								3.2	3.2		3.2	3.2		3.4	3.9b	6.1abc	6.6abc	6.8abc	7abc	7.0ab	7.7
	STP9								3.7	3.7		3.7	3.7		4.1	4.6ab	5.9abc	6.3abcd	6.6abc	6.8abc	7.2ab	7.7
	Pokkali								3.0	3.0		3.0	3.2		3.4	4.1b	4.6bc	4.8d	5.2bc	6.1bc	6.3b	6.8
	IR64								3.4	3.4		3.7	4.3		5.0	6.3a	6.3ab	6.8ab	7.0ab	7.7a	7.7ab	8.3
	CWY981126								3.2	3.4		3.4	3.7		4.1	5.0ab	5.4abc	6.3abcd	6.6abc	7.2abc	7.4ab	7.4

*Means with the same letter of a row are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

外，其餘品種(系)之植株均已死亡。處理結果發現在第 5 日除'Pokkali'、STP1、STP3、STP4 及 STP6 外，所有品種(系)之耐鹽等級均達 5 級，處理第 9 日除'Pokkali'外，所有品種(系)耐鹽等級均達 7 級以上。經變方分析結果，顯示每日品系間之耐鹽等級表現均達顯著差異水準，其中以耐鹽品系 STP3 及親本'Pokkali'於模擬鹽分逆境中有較佳的耐鹽表現。

所有品系最高分蘗期以 200mM NaCl 的鹽水進行鹽分逆境處理，結果於處理第 9 日開始進行調查直至第 28 日，並隨時維持水稻植株處於鹽水 3–5 cm 狀態。結果發現處理後第 18 日，表現最佳品系 STP7 耐鹽等級平均為 3.7 級，而表現最差之品系 STP1、STP4 及 STP5 耐鹽等級平均為 5.7 級；處理後 20 日，除 STP7 及'Pokkali'之外，其餘品種(系)之耐鹽等級均達 5 級；處理 28 日除 STP7 及'Pokkali'之外，其餘品種(系)耐鹽等級均達 7 級以上且部分單株完全乾枯死亡。經變方分析結果，顯示品系間於處理後第 16 日才開始有顯著差異水準，多重比較後發現耐鹽品系 STP7 於最高分蘗期後的耐鹽性表現最佳，甚至優於其耐鹽親本'Pokkali'。

討論

分子標幟輔助水稻耐鹽性選育

分子標幟輔助回交育種，為一準確且有效率的育種方法，可將單一性狀轉移至優良品種中(Collard and Mackill 2008)。一般傳統回交育種中，BC_1、BC_2 及 BC_3 回交後代之遺傳背景回復到輪迴親之理論值分別為 75、87.5 及 93.8%，但在實際操作上可能會因回交族群數量不夠龐大或兩親本遺傳背景差異較大，致使得回交後代遺傳背景回復到輪迴親的比率常較理論值低。

Gregorio *et al*. (1997)利用'Pokkali'與'IR29'進行雜交後自交產生 RILs，進一步用分子標幟發現在第一條染色體上 10.7–12.2 Mb 有一與控制 Na^+/K^+比率有關之 QTL，命名為 *Saltol*，對耐鹽等級變異的解釋率約為 27%。其後多位學者於此區間設計了多個緊密連鎖之分子標幟。本試驗使用 1 個緊密連鎖之分子標幟 CH0113 及兩個鄰近兩側之分子標幟 RM10695 及 RM10793，用以淘汰不帶有 *Saltol* QTL 之回交後代，進而選出帶有 *Saltol* QTL 耐鹽基因之水稻植株。

Neeraja *et al*. (2007)利用 1 個緊密連鎖 *sub1*、2 個 *sub1* 位於基因兩側及 36 個與 *sub1* 基因無連鎖的分子標幟，分別進行耐淹水稻回交後代族群之前景、重組及背景選拔，欲將 IR49830-7 品系所帶有的 sub1 耐淹水基因導入到'Swarna'品種中。結果指出 BC_1、BC_2 及 BC_3 回交世代中與'Swarna'遺傳背景相似度平均值分別約為 67.9、90.7 及 96.2%，顯示透過分子標幟輔助回交育種在 BC_2 及 BC_3 世代皆可提高遺傳背景回復到輪迴親之比率。而本試驗利用 3 個前景分子標幟及 107 個背景分子標幟，結果在 BC_1F_1 世代與 CWY981126 之遺傳背景相似度約為 79.5%，BC_2F_1 世代約為 91.7%，BC_2F_2 世代與 CWY981126 之遺傳背景相似度最高者達 97%。顯示在 BC_1 及 BC_2 回交世代之遺傳背景相似度皆超出傳統育種之理論值，同時也達到預期分子標幟輔助選拔之目標，可知本試驗之回交後代族群數量及使用之分子標幟數量應已相當足夠。

Huyen *et al*. (2013)使用 FL478 作為貢獻親，利用分子標幟輔助回交育種法將帶有之 *Saltol* QTL 轉移進入越南水稻品種'Q5DB'中，結果耐鹽對照品種之耐鹽等級表現為 9 級，而 BC_3F_1 回交世代之三株獲選植株耐鹽等級表現為 3–5 級，獲選之耐鹽 BC_3F_2 世代植株耐鹽等級表現則與耐鹽親本 FL478 相同，遺傳背景大致上也已回復到'Q5DB'之遺傳背景。上述結果顯示，未來若擬透過鹽分地種植耐鹽水稻以增加糧食生產，其耐鹽水稻之培育以分子標幟輔助將耐鹽性導入優良品種的方式最具效益，而耐鹽稻的育成亦將有助於臺灣對土壤鹽鹼化、可耕地面積減少及糧食自給率增加等有所幫助。

一般傳統回交育種操作常需與輪迴親回交 6 次以上，如此方可與輪迴親之遺傳相似度方可達到 99%以上，而透過分子標幟輔助回交育種則在 BC_3、BC_4 就可達成，甚至於 BC_2 世代便可達到 99%的遺傳相似度(Frisch *et al*. 1999, Collard *et al*. 2005, Hasan *et al*. 2015)。因此，雖然分子標幟輔助育種最初可能花費較多資源，惟一旦建立一套有效率的系統時，則新品種育成時期將可節省 3–5 年時間，同時更節省了土地及人力的投入，而且操作上也簡單易行，能更有效率且準確的選拔目標性狀。

BC_2F_2 世代耐鹽性篩選及評估

Huyen*et al*. (2012)利用分子標幟輔助回交育種，將'Pokkali'/'IR29'之 F_8 重組自交系 FL478 之 *Saltol* QTL 導入越南品種'AS996'中，其經 EC 值 12 dS m^{-1} 之模擬鹽分逆境測試發現，感鹽親本'IR29'之耐鹽等級為 9 級，對鹽分為極度敏感，耐鹽親本 FL478 之耐鹽表現表現為 3 級，表現為極度耐鹽，而 BC_3F_1 回交後代之耐鹽表現則為 3–5 級，呈現為中度耐鹽。結果顯示，透過分子標幟輔助回交育種導入 *Saltol* QTL 有效提高'AS996'之耐鹽性。本試驗同樣將 *Saltol* QTL 透過分子標幟輔助回交育種堆疊到 CWY981126 品系中，結果發現 BC_2F_2 回交後代耐鹽表現雖不及耐鹽親本'Pokkali'，但較 CWY981126 之耐鹽表現較佳，此與 Huyen *et al*. (2012)之 BC_3F_1 回交後代耐鹽性表現稍差的現象相似。據此，推測本研究 BC_2F_2 回交後代之耐鹽表現較親本'Pokkali'差原因可能如下：(1)CWY981126 本身的耐鹽機制可能與'Pokkali'相似，因此無法透過堆疊 *Saltol* QTL 來提高 CWY981126 之耐鹽性，即兩親本所帶之耐鹽基因不具累加性。(2)本試驗之模擬鹽水溶液 EC 值約為 25 dS m^{-1}，由於鹽分逆境相對較高，對於極耐鹽之親本'Pokkali'造成植株之生長緩慢、發育停滯或修復損傷之影響較小，故耐鹽等級表現較為穩定，但相對於耐鹽性本身不如'Pokkali'之 BC_2F_2 回交後代，可能因為 salt shock 效應大，致使直接造成植株損傷大且無法修復損傷，故使得耐鹽等級表現有明顯較差的情形出現。

獲選品系於不同鹽分濃度下之耐鹽性評估

Majeed *et al.* (2013)利用 6 個水稻品種，針對種子發芽率、發芽時間、地上部長、根長、地上部乾重、根乾重等農藝性狀進行 0、30、60、90、120 及 150 mM NaCl 六種不同濃度的模擬鹽分逆境測試，結果顯示不論是種子發芽率、發芽時間或是地上部及地下部的生長，都會隨著鹽分濃度的提高而受到抑制，而在其他研究報告中也有相似的結果(Xue *et al.* 2004, Akbari *et al.* 2007, Hakim *et al.* 2010)。Wang *et al.* (2012)針對耐鹽生理方面進行研究，利用 0、100、120 mM NaCl 三種不同模擬鹽分濃度，針對地上部 Na^+ 及 K^+ 含量和根部 Na^+ 及 K^+ 含量之變化進行探討，結果發現在模擬鹽分逆境下植株體內 Na^+ 及 K^+ 的含量均隨著鹽分濃度的提高而上升。顯示在模擬高鹽分濃度下，水稻會因外在溶液中含有高濃度的 Na^+ 而提高 Na^+ 的吸收量，而水稻在鹽分逆境下為維持 Na^+/K^+ 比率也會提高 K^+ 的吸收量。本試驗雖僅針對水稻植株外觀進行耐鹽等級判別，亦觀察到上述農藝性狀及生理性狀相似的結果，在模擬鹽分逆境下水稻之耐鹽等級會隨著鹽分濃度提高，而在較短時間內達到較高的耐鹽等級。由此顯示，高鹽分濃度會強烈抑制水稻秧苗的生長及發育，而對植株葉片造成嚴重傷害，而在低鹽分濃度下植株的生長發育則受到較輕微的抑制，使植株有較多時間可以進行滲透調節或是毒性離子排除等調節功能，進而拉長存活時間。因此，在本試驗低模擬鹽分濃度下，植株可存活 20 日以上，而在高濃度下植株在 9 日即全數死亡。

檢視 12 個品種(系)的耐鹽表現，在不同氯化鈉濃度的處理結果，顯示 STP3、STP7 及 STP8 三個品系在耐鹽性上的表現較為優越，雖未有超越貢獻親'Pokkali'的表現，但與輪迴親 CWY981126 相較下，該三個品系

具有較強的鹽分耐受力。試驗結果亦顯示，獲選的回交後代在導入貢獻親‘Pokkali’所帶有的 *Saltol* QTL 後，由於 *Saltol* QTL 可提高鹽分逆境下之 Na^+/K^+ 比率維持能力，因此可提高回交後代之耐鹽性。惟‘Pokkali’所帶有的 *Saltol* QTL 僅貢獻 27%的外表型變異解釋率，又水稻全基因組其他位置尚有未發現之耐鹽相關基因存在，回交後代未能全然聚合這些耐鹽基因致使無法像‘Pokkali’具極高之耐鹽性是可理解的結果。因此，未來將再利用譜系法純化 STP3、STP7 及 STP8，其後再直接於臺灣鹽化土地進行栽培與產量評估，經此程序應較有機會選育出高耐鹽並具有穩定產量之水稻新品種。

獲選品系於不同生長期之耐鹽性評估

Rad*et al.* (2012) 利用伊朗栽培品種‘Hashemi’進行不同鹽分濃度下不同生長時期對鹽分逆境反應表現的評估，結果發現不同生長時期下遭受鹽害對產量構成要素會有不同的影響，通常在分蘗期及幼穗分化期遭受鹽害對水稻總產量會有較大的影響，且會隨著鹽分濃度升高而有較大的產量下降幅度。本試驗於最高分蘗期後進行曬田，隨後即施以鹽水灌溉，結果同樣發現在大部分品系的生長受到嚴重影響，僅品系 STP7 及親本‘Pokkali’有較佳的耐鹽表現。因此，就 5 葉齡及最高分蘗期後模擬鹽分逆境處理結果來看，品系 STP3 似在秧苗期具有較佳耐鹽性，品系 STP7 則具有成株期(最高分蘗期)的耐鹽性，未來可於 STP3 及 STP7 完成純化及實用性評估後，提供臺灣鹽化土地之栽培與利用。尤其針對目前臺灣沿海之 EC 值低於 10 dS m^{-1} 以下之鹽化土地，本研究培育之耐鹽材料應有相當大的發揮潛力。

引用文獻

Akbari G, SA Mohammad, SYousefzadeh (2007) Effect of auxin and salt stress (NaCl) on seedgermination of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). Pakistan **J. Biol. Sci.** 10(15):2557–2561.

Ali S, RK Gautam, R Mahajan, SL Krishnamurthy, SK Sharma, RK Singh, AM Ismail (2013) Stress indices and selectable traits in *saltol*QTL introgressed rice genotypes for reproductive stage tolerance to sodicity and salinity stresses. **Field Crops Res.** 154:65–73.

Cattivelli L, F Rizza , FW Badeck , E Mazzucotelli ,AM Mastrangelo , E Francia, C Mare ,A Tondelli, AM Stanca (2008) Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. **Field Crop Res.** 105:1–14.

Cheng L, Y Wang, L Meng, X Hu, Y Cui, Y Sun, L Zhu, J Ali, J Xu, Z Li (2012) Identification ofsalt-tolerant QTLs with strong genetic background effect using two sets of reciprocal introgression lines in rice. **Genome** 55:45–55.

Collard BCY, DJ Mackill (2008) Markerassisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Phil. Trans. R. Soc.** B 363:557–572.

Collard BCY, CM Vera Cruz, KL McNally, PS Virk, DJ Mackill (2008) Rice molecularbreeding laboratories in the genomics era: Current status and future considerations. **Intl. J. Plant Genom.** 2008:524–547.

Collard BCY, MZZ Jahufer, JB Brouwer, ECK Pang (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker assisted selection for crop improvement: The basic concepts. **Euphytica** 142:169–196.

Dokku P, KM Das, GJN Rao (2013) Pyramiding of four resistance genes of bacterial blight in Tapaswini, an elite rice cultivar, through marker-assisted selection. **Euphytica** 192:87–96.

Frisch M, M Bohn, AE Melchinger (1999) Comparison of Selection Strategies for Marker-Assisted Backcrossing of a Gene. **Crop Sci.** 39:1295–1301

Gregorio GB, D Senadhira, RD Mendoza (1997) Screening rice for salinity tolerance. IRRI Discussion Paper Series No. 22. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.

Hakim MA, AS Juraimi, M Begum, MM Hanafi, MR Ismail, A Selamat (2010) Effect of salt stress on germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). **Afr J. Biol.** 9(13): 1911–1918.

Hasan MM, MY Rafii, MR Ismail, M Mahmood, HA Rahim, MA Alam, S Ashkani, M Malek, MA Latif (2015) Marker-assisted backcrossing: a useful method for rice improvement. **Biotechnology & Biotechnological Equipment.** 29(2):237–254.

Hittalmani S, A Parco, TV Mew, RS Zeigler, N Huang (2000) Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. **Theor. Appl.**

Genet. 100:1121–1128.

Hsu YK (2010) Comparative Proteomic Analysis of Initial Salt-stressed Rice Seedlings TNG 67 and its Salt-sensitive Mutant SA0604, Salt-tolerant Mutant SM75. (in Chinese with English abstract) Master Thesis. Graduate Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 128pp.

Huyen LTN, LM Cuc, AM Ismail, LH Ham (2012) Introgression the Salinity Tolerance QTLs *Saltol*into AS996, the Elite Rice Variety of Vietnam. **Amer. J. Plant Sci.** 3:981–987.

Ismail AM, MJ Thomson, G.V Vergara, MA Rahman, R.K Singh, GBGregorio (2010) Designing resilient rice varieties for coastal deltas using modern breeding tools. p.154–165. *In*: Tropical deltas and coastal zones: food production, communities and environment at the land-water interface. CABI, Wallingford, UK.

Jwo WS, CG Chern, MH. Lai, HM Yen, TH Tseng, H E Yen (2008) Screening technique for salt tolerance in the rice seedling stage. **J. Taiwan Agric. Res.** 57:193–204. (in Chinese with English abstract)

Kazuhiro K, Y Niwa, T Yamaguchi, H Sunohara, H Hirano, M Umeda (1998) A rapid and easyhandling procedure for isolation of DNA from rice, *Arabidopsis* and tobacco. **Plant Biotechnol.** 15:45–48.

Khan MA, M Naeem, M Iqbal (2014) Breeding approaches for bacterial leaf blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.), current status and future directions. **Eur J Plant Pathol.** 139:27–37.

Luo YC, ZC Yin (2013) Marker-assisted breeding of Thai fragrance rice for semi-dwarf phenotype, submergence tolerance and disease resistance to rice blast and bacterial blight. **Mol Breeding.** 32:709–721

Luo WL,T Guo,QY Yang, H Wang, YZ Liu, XY Zhu,ZQ Chen (2014) Stacking of five favorable alleles for amylase content, fragrance and disease resistance into elite lines in rice (Oryza sativa) by using four HRM-based markers and a linked gel based marker. **Mol Breeding.** 34:805–815.

Luo YC, S Zakaria, B Basyah, TC Ma, ZF Li, JB Yang, ZC Yin (2014) Marker-assisted breeding of Indonesia local rice variety Siputeh for semi-dwarf phenotype, good grain quality and disease resistance to bacterial blight. Rice 7:33

Majeed KA, AS Ali, HH Hasan, RH Ghal (2013) Salt Tolerance Study of Six Cultivars of Rice (*Oryza sativa* L.) During Germination and Early Seedling Growth. **J. Agric. Sci.** 5(1):1916–9752

Neeraja CN, R Maghirang-Rodriguez, A Pamplona, S Heuer, BCY Collard, EM Septiningsih, G Vergara, D Sanchez, K Xu, AM Ismail, DJ Mackill (2007) A marker-assisted backcross approach for developing submergence-tolerant rice cultivars. **Theor. Appl. Genet.** 115:767–776.

Ponnamperuma FN (1984) Role of cultivar tolerance increasing rice production in saline lands. p.255–271. *In*: Salinity Tolerance in Plants. RC Staples, GH Toemnnniessen (Eds.) Willey-Interscience, New York.

Shinada H, N Iwata, T Sato, K Fujino (2014) QTL pyramiding for improving of cold tolerance at fertilization stage in rice. **Breed. Sci.** 63: 483–488

Shi WW, Y Yang, SH Chen, ML Xu (2008) Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. **Mol Breed.** 22:185–192.

Suh JP, SJ Yang, JU Jeung, A Pamplona, JJ Kim, JH Lee, HC Hong, CI Yang, YG Kim, KK Jena (2011) Development of elite breeding lines conferring Bph18 gene-derived resistance to brown planthopper (BPH) by marker-assisted selection and genome-wide background analysis in japonica rice (*Oryza sativa* L.). **Field Crops Res.** 120:215–222.

Thomson MJ, MD Ocampo, J Egdane, MA Rahman, AG Sajise, DL Adorada, E Tumimbang-Raiz, E Blumwald, ZI Seraj, RK Singh, GB. Gregorio, AM Ismail (2010) Characterizing the *saltol* quantitative trait locus for salinity tolerance in rice. **Rice** 3:148–160.

Vu HTT, DD Le, AM Ismail, HH Le (2012) Marker-assisted backcrossing (MABC) for improved salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) to cope with climate change in Vietnam. **AJCS.** 6(12):1649–1654.

Wang ZF, ZW Chen., JP Cheng, YY Lai, JF Wang, YM Bao, J Huang, HS Zhang (2012) QTL Analysis of Na+ and K+ Concentrations in Roots and Shoots under Different Levels of NaCl Stress in Rice (*Oryza sativa* L.). **Plos One** 7(12):e51202.

Xue ZY, DY Zhi, GP Xue, H Zhang, YX Zhao, GM Xia (2004) Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Tritivum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na^+/H^+antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na^+. **Plant Sci.** 167:849–859.

Yoshida S, DA Forno, JH Cook, KA Gomez (1976) Routine procedures for growing rice plants in culture solution. p.61–65. *In*: Laboratory manual for physiological studies of rice. S Yoshida, DA Forno, JH Cook, KA Gomez (Eds.) International Rice Research Institute Press, Philippines.

－編輯：楊純明